

DENDRITIC POLYMER OF MULTIPLE ANTIGEN PEPTIDE SYSTEM USEFUL AS ANTI-MALARIAL VACCINE**Publication number:** JP3503539T**Publication date:** 1991-08-08**Inventor:****Applicant:****Classification:**

- International: A61K39/015; A61K39/385; C07K7/06; C07K7/08; C07K14/00; C07K14/44; C07K14/445; C07K17/08; C07K19/00; A61K39/00; A61K39/002; A61K39/385; C07K7/00; C07K14/00; C07K14/435; C07K17/00; C07K19/00; A61K39/00; (IPC1-7): A61K39/015; A61K39/385; C07K7/06; C07K7/08; C07K7/10; C07K17/08; C07K99/00

- European: C07K14/445; C07K17/08

Application number: JP19900507483 19900410**Priority number(s):** US19890336852 19890412**Also published as:**

WO9011778 (A
EP0423315 (A1
EP0423315 (A4
EP0423315 (A0

Report a data error he

Abstract not available for JP3503539T

Abstract of corresponding document: **WO9011778**

Multiple antigen peptide systems are described in which a large number of each of T-cell and B-cell malarial antigens are bound to the functional groups of a dendritic core molecule providing a high concentration of antigen in a low molecular volume. The products elicit a very strong immunogenic response.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫ 公表特許公報(A)

平3-503539

⑬ 公表 平成3年(1991)8月8日

⑭ Int. Cl.⁵C 07 K 17/08
A 61 K 39/015
39/385

識別記号

庁内整理番号

8619-4H
8829-4C
8829-4C※

審査請求有

予備審査請求 未請求

部門(区分) 3(2)

(全 11 頁)

⑯ 発明の名称 抗マラリヤワクチンとして有用な多重抗原ペプチドの樹木状ポリマー

⑰ 特 願 平2-507483

⑱ 出 願 平2(1990)4月10日

⑲ 翻訳文提出日 平2(1990)12月12日

⑳ 国際出願 PCT/US90/02039

㉑ 国際公開番号 WO90/11778

㉒ 国際公開日 平2(1990)10月18日

優先権主張 ㉓ 1989年4月12日 ㉔ 米国(US) ㉕ 336,852

⑳ 発 明 者 タム, ジェームズ ビイ.

アメリカ合衆国、10021 ニューヨーク、ニューヨーク、イースト
シックスティースード ストリート 500㉑ 出 願 人 ザ ロックフェラー ユニバー
シテイアメリカ合衆国、10021 ニューヨーク、ニューヨーク、ヨーク
アベニュー 1230

㉒ 代 理 人 弁理士 三宅 正夫 外1名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広
域特許), US

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

請 求 の 範 囲

1. B-細胞エпитープ及びT-細胞エピトープの物質ペプチドより成る群から選ばれる、複数のT-細胞エピトープ及びB-細胞エピトープの両分子が結合されている官能基を有する樹木状ポリマーを含んで成る、抗原生成物。
2. 少なくとも1種のT-細胞及びB-細胞のエピトープペプチドが縦1列で同一官能基に結合されている、請求の範囲第1項に記載の生成物。
3. T-細胞及びB-細胞エピトープペプチドが ビー・バーゲン、ビー・ノーレシ、ビー・ヨエリ、ビー・マラリヤ、ビー・オヤレ、ビー・フェルシバラム及びビー・ヒバックスより成る群から選ばれる少なくとも1種のマラリヤ種のサーカムボロゾイト蛋白質に由来するT-細胞及びB-細胞エピトープペプチドから成る、請求の範囲第1項に記載の生成物。
4. B-細胞エピトープペプチドが
 - (a) (NANP) x ;
 - (b) (DRAZGQPAG) x ; ただし Z は A 又は D から独立に選ばれる ;
 - (c) (QAQGDGANAGQP) ⁵ ;
 - (d) (DPPPPNPN) x ;
 - (e) (YAAA(A)nCGG(G)mN) x ; ただし、Y は独立に D 又は C であり、n は 0 又は 1 であり、m は独立に 0 又は 1 である ;
 - (f) 上記シーケンスの組み合わせ ;
 - (g) 繰返単位(a)乃至(e)の各々の環状配列物よりなるペプチド (式中、x は少なくとも1の整数である)

より成る群から選ばれるアミノ酸シーケンスを含んで成り ;

そしてT-細胞エピトープがB-細胞エピトープと同一の物質種のCS蛋白質に由来する1種以上のT-細胞エピトープである、請求の範囲第3項に記載の生成物。

5. 樹木状ポリマーの官能基にT-細胞エピトープペプチドが懸下、結合されており、そして同一物質種に由来するB-細胞エピトープペプチドが、所望によって結合体を介して、前記T-細胞ペプチドの他端に懸下結合されている、請求の範囲第4項に記載の生成物。

6. 同一物質種に由来する1つより多いT-細胞エピトープペプチドが上記物質種に由来する少なくとも1つのB-細胞エピトープペプチドと共に含まれている、請求の範囲第4項に記載の生成物。

7. 請求の範囲第1〜6項のいずれか1項に記載の生成物を免疫原性的に有効な量で含んで成る、マラリヤに対するワクチン。

8. 哺乳動物にマラリヤに対する免疫性を与える治療が必要とされるときに、請求の範囲第1〜6項のいずれか1項に記載の生成物を免疫原的に有効な量で投与することを含んで成る、哺乳動物に抗マラリヤ免疫性を与える方法。

特許(内容に変更なし)

明 細 書

抗マラリヤワクチンとして有用な多重
抗原ペプチドの樹木状ポリマー

ワクチンはしばしば抗原を蛋白質、炭水化物、脂質又はリポソームのような担体に担持して含む。斯るワクチンは有用なもので、多年の間使用されてきた。しかし、それらワクチンに関して多数の問題があることはこの技術分野で認められている。これら問題の幾つかは担体に関係する。担体は天然源から単離されるので、それらは往々にして品質が均一でない。更に、費用がかさみ、しかも骨の折れる精製についての努力にもかかわらず、天然の汚染物質を完全に含まない生成物を提供することは困難で、しばしば不可能である。このような汚染物質はそれら自体抗原性となることがある。それら汚染物質はワクチンの使用としばしば結び付いた望しくない副作用、特に発熱と組織膨化を引き起こす。更に、抗原の濃度は、担体と反応し、あるいは担体の表面に吸着される抗原の量が均一でないためにバッチ毎に変化することがある。この問題は対マラリヤ動物に運したワクチンを製造することの困難を著しく増加させた。

マラリヤは世界中で2億人もの人に影響を及ぼすものであるため合成ワクチンの特に重要な標的であるが、免疫予防は今までに開発されていない。げっし類、猿及びヒトマラリヤのスボロゾイトに対する防御免疫性は照射済スボロゾイトによる免疫化によって誘発させることは知られている。このスボロゾイトの主要蛋白質はサーカススボロゾイト(circumsporozoite:CS)蛋白質であるが、このCS蛋白質に対して向けられる抗体は寄生体の産能力を中和し、抗体が肝細胞に入るのを抑制することが知られている。かくして、CS蛋白質はマラリヤのスボロゾイト感染に対す

cad, Sci., 85, 1199-1203 (1988); シニガグリア・エフ等Eur. J. Immunol., 18, 633-636 (1988); 及びグッチンガー・エム(Guttinger, M)等のEMBO J., 7, 2555-2557 (1988)を参照されたい。

樹木状ポリマーは新しいポリマー群である。これらポリマーは分子容の単位当りの官能基濃度が通常のポリマーより高いことに特徴がある。それらポリマーは一般に少なくとも2個の官能基を有するコア分子に由来する2本以上の同一分枝鎖に基づく。このようなポリマーは米国特許第4,289,872号明細書においてデンケワルター(Denkewalter)等により、米国特許第4,599,400号及び同第4,507,466号明細書を含めて幾つかの米国特許明細書においてトマリア(Tomalia)等により述べられている。これらのポリマーは、それらの構造がコアとしての1本の幹と数本の枝を持つ木として象徴することができることから、しばしば樹木状ポリマーと称されている。木と違って、樹木状ポリマーの枝は全て実質的に同じである。

本発明の生成物は斯る樹木状ポリマー系に基づくもので、この系において抗原はコア分子から放射状に延びている枝に共有結合されている。この系に多重(multiple)抗原ペプチド系という名称が付けられているが、本明細書では時にはMAPSとも称される。後記の説明から明らかであるように、本発明の生成物を形成するのに用いられる担体、即ちコア分子のあるものはそれらコア分子が通常ではポリマーとはみなされないかもしれないような分子量を持つものである。しかし、それらの基本的構造は樹木状ポリマーと同様であるので、それらをそのように述べるのが便利である。従って、本明細書において用語「樹木状ポリマー」は時に本発明生成物の本発明性質を定義すべく用いられる。この用語に

る合成ワクチンの開発の1つの重要な標的となった。CS蛋白質の免疫優勢B-細胞エピトープは全てのマラリヤ種のCS蛋白質に共通の1つの特徴であるCS蛋白質の遠近ドメイン内に含まれる。このB-細胞エピトープの蛋白質担体としての破壊風トキソイドに結合させた合成ペプチドを用いて免疫化したマウスは10⁴個のスボロゾイトにより高い抗体力価と耐チャレンジ性を発現させることが見出された。しかし、同様の方法を用いてヒトに接種する試みがなされているが、良好な抗体力価は誘発されていない。

最近、ビー・バーゲイ(P.berghel) (げっし類マラリヤ)のCS蛋白質の幾つかのT-ヘルパー細胞エピトープも同定された[ロメロ(Romero)等のEur. J. Immunol., 18, 1951 (1988)を参照されたい]。ビー・バーゲイのCS蛋白質のB及びTヘルパー細胞エピトープの同定は今や、J. Biol. Chem., 263, 1719 (1988)に記載される、タム(Tam)とその共同研究者によって開発された方法を用いてエピトープを規定された樹木状ポリマーに結合させるMAP法を用いる特定の、明確なやり方でこれらエピトープを1つの分子の中に組み込むことを可能にした。加えて、他のマラリヤ種のT-細胞エピトープが同定された。例えば、シニガグリア・エフ(Sinigaglia, F.)等のNature, 336, 778 (1988) (ビー・ファルシバラム(P.falciparum)); クリサンティア・エー(Crisanti, A)等のScience, 240, 1324 (1988) (ビー・ファルシバラム、血液段階); クマー・エス(Kumar, S)等のNature, 334, 258 (1988) (ビー・ファルシバラム スボロゾイト)等; グッド・エム・エス(Good, M.S.)等のScience, 285, 1059-1062 (1987); グッド・エム・エス等のProc. Nat'l. A

はポリマーと見なされるほど十分に大きい担体分子だけでなく、3個程度の少数のモノマーを含むものも包含される。

樹木状ポリマーには広範囲の抗原の担体として有効に機能する能力があることがここに発見された。

本発明は樹木状ポリマーの構造についての簡単な説明から更によく理解できるであろう。

樹木状ポリマーは少なくとも2官能性のコア分子に作られる。コア分子にある官能基の各々は少なくとも2つの分枝鎖を形成し、その主単位も少なくとも2官能性である。分枝鎖中各2官能性単位は更に生長するためのベースとなる。

この系は特定の分子を参照すると更によく視覚化することが可能である。例えば、2個のアミノ基を持つリシンをそのカルボキシル基を介してペプチド結合でアラニン又はグリシン(これらは順次結合して樹幹となり得る)のアミノ基に結合させる場合、得られる分子は2個の遊離のアミノ基を有することとなる。このジペプチドは第一世代と見なすことができる。ジペプチドは2個の追加リシン分子にペプチド結合を形成させることにより結合させて4個の遊離アミノ基を持つ第二世代分子を生成させることができる。この方法を繰り返すことによって第三、第四又は更に高次の世代の生成物を形成することが可能である。各世代の共に遊離アミノ基の数は幾何学的に増加する。この数はnを世代数とすると、2ⁿで表わすことができる。

この化合物には特に高分子量のものはないけれども、これらを樹木状ポリマーと称するのが便利である。

第1図はリシンに基づく8世代の樹木状ポリマーのコア分子を示すもので、8個の有効アミノ基は各々グリシン結合体分子を介してペプチド抗原に結合されている。

同じタイプの反応をアスパラギン酸又はグルタミン酸を用いて実施することが可能である。これら両アミノ酸は2°位の遊離カルボキシル基を有するポリアスパラギン酸又はポリグルタミン酸を生成させる2個のカルボキシル基と1個のアミノ基を有する。

これらタイプの合成を遂行するのに必要な化学は公知でかつ利用可能である。アミノ酸に關し、反応すべきでない官能基を封鎖し、またそれら官能基が反応すべきことが望まれるときにそれら封鎖基を脱離させるための化学は多数の特許明細書及び技術文献中の報文に詳細に記載されている。

樹木状ポリマーは周知のメリフィールド (Herrifield) 合成におけるように樹脂上に生成させ、次いでそのポリマーから取り出すことが可能である。

トマリアはコア分子としてアンモニア又はエチレンジアミンを用いた。この方法において、コア分子はアクリル酸エステルとミカエル (Michael) 付加により反応せしめられ、そのエステル基は加水分解により除去される。得られる第一世代分子はアンモニアの場合3個の遊離カルボキシル基を含有し、またエチレンジアミンを用いる場合は4個の遊離カルボキシル基を含有する。トマリアはその樹木状ポリマーをエチレンジアミンにより、続いてアクリル酸エステルモノマーにより鎖延長し、そしてその配列を所望とされる分子量が得られるまで繰り返している。しかし、当業者には容易に分かるだろうように、樹木状ポリマーの各分枝は多数の選択された方法のどれによってもその長さを伸ばすことができる。例えば、各分枝はリシン分子との多重反応により鎖延長することが可能である。

エリックソン (Erickson) は實質的に任意の所望分子量を持つポリペプチドを固体樹脂支持体から生長させる古典的なメリフィ

ールド法を利用した。この方法を樹木状ポリマーの製造に用いるので、そのポリマーを樹脂支持体に結合させる結合用分子は3官能性である。官能基の1個は樹脂に対する結合の中に含まれ、他の2個の官能基はポリマー生長の出発点として役立つ。ポリマーは所望とされる分子量が得られたときに樹脂から脱離される。1つの標準的な閉鎖法は液体沸化水素で0℃において1時間処理する方法である。もう1つの更に満足すべき方法はタム等が J. Am. Soc., 105, 6442 (1983) で述べているように沸化水素とジメチルフルフィドとの錯体 (HP:DMF) を利用する方法である。この方法は副反応及びペプチドの損失を著しく低下させる。

デンケウオルターはその方法の1例においてリシンをコア分子として利用している。このコア分子のアミノ基はウレタン基に転化することによって封鎖される。カルボキシル基はベンズヒドリルアミンとの反応によって封鎖される。それらウレタン基を加水分解すると、樹木状ポリマー生長の出発点として役立つ2個の遊離アミノ基を持つリシンのベンズヒドリルアミドが生成する。

樹木状ポリマーを製造するのに利用可能な方法のうちの3方法についてのこの簡単な概説は当業者に現在の技術の基本的原理を教示するのに十分なものであろう。これら方法はまた当業者にポリマーの顕著な特徴を教示している。その最も重要な特徴の1つは小さな分子容の中に非常に多数の利用可能な官能基を与えることである。その結果は、抗原をこのような有効官能基に結合させることによって小容積中に高濃度の抗原が達成可能となることである。更に、得られる分子生成物は相対的に小さな担体上に抗原を高割合で含有する。このことはワクチンのベースとして使用された従来の生成物とはっきり違う点である。これら従来の生成物

はしばしば大量の担体上に担持された少量の抗原より構成される。

抗原の担体としての樹木状ポリマーの他の重要な特徴は、正確な構造が分かり、自から抗原性となり、組織を刺激し、あるいは他の望ましくない反応をもたらす汚染物質が存在せず、抗原の正確な濃度が分かり、抗原が担体上に対称的に分布され、そして担体は1個より多くの抗原のベースとして利用することが可能で、そのため多価ワクチンを製造することができる、ということである。本発明の具体的ワクチンのベースとしてのMAPS法の主たる利点は、かぎ穴カサガイのヘモシアニン、破傷風のトキソイド及び牛の血清アルブミン等の天然担体を使用する従来の系とは違って、本発明の担体は抗原が判明した濃度で分散される、完全に定義される化学的に実存するものであることである。更に、その抗原はその分子の大部分を含有、天然担体の場合のように比較的少ない、定義されない割合の分子ではない。

本発明のワクチンの場合、コア分子は通常の代謝経路に続いて体で取り扱えるようにリシン等の天然産のアミノ酸であるのが好ましい。しかし、後記において更に十分に説明されるように、天然のものではないアミノ酸、更にはα-アミノ酸でないものでも使用することができる。コア分子をつくる際に用いられるこれら酸又は他の任意の非対称分子はD型でも、あるいはL型でもどちらでもよい。

上記では樹木状ポリマーをポリアミドポリマーとして主として説明したけれども、本発明の担体は樹木状ポリアミドに限定されないことは容易に分かるだろう。少なくとも2個の利用可能な官能基を持つ広範囲の分のいずれもコア分子として役立つのである。例えば、プロピレングリコールがポリエステル系樹木状ポリマーのベースとして役立つ。これは酸は選択されたグリコ

ール又はアミンと共にポリエステル又はポリアミドを生成させるコア分子として役立つことができる。ジソシアネートはポリウレタンを生成させるために用いることができる。重要な点は、コア分子は少なくとも2個の利用可能な官能基を有し、それら官能基より、各分枝上に同様に少なくとも2個の利用可能な官能基又は係止 (anchoring) 基を有する追加の分子との逐次足場型反応により同一の分枝を生成させ得ることである。コア分子が2個の利用可能な官能基を有し、そして各後続世代のものが2個の利用可能な官能基を有する最も単純な場合は、本発明で用いられるマラリヤ経路のT-細胞及びB-細胞の抗原が係止される得る係止座位の数はnを世代数として(2)ⁿで表わされる。

樹木状ポリマー化学の更に完全な議論についてはタマリア等の Polymer Journal, 17 (1), 117 (1985)、アカロニ (Akaroni) 等の Macromolecules, 15, 1093 (1982) 及び次の米国特許明細書：

第4,289,872号	第4,558,120号
第4,376,861号	第4,568,737号
第4,507,466号	第4,587,329号
第4,515,920号	第4,599,400号
第4,517,122号	第4,600,535号

に注意を向けられたい。

引用した全ての特許、特許出願及び文献はそれらの全体を本明細書で引用、参照するものである。

本発明

本発明は、現在好ましい態様において、得られる構造が丁エビトープペプチド及びBエビトープペプチドの両者を有するように複数の係止座位をCS蛋白質のようなマラリヤ蛋白質の抗原性T

一細胞エビトープ及びB-細胞エビトープに共有結合して有する樹木状ポリマーベースを含んで成る多重抗原ペプチド系を提供するものである。樹木状ポリマーは少なくとも2個の官能基を有する中心コア分子を含み、そのコア分子には末端官能基を有する分子分枝鎖が共有結合されている。分枝鎖上の末端官能基はエビトープペプチドに共有結合されている。抗原分子は本明細書では主としてペプチド抗原として述べられるが、それらはペプチド抗原、更には抗原に限定されるものではない。かくして、自らは抗原性でないペプチドがそれがコア分子に結合されるとき抗原性となることがあるのである。

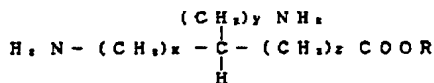
選択された抗原は別個に合成(この技術分野で周知のように組織DNA法-これに限定されない-を含めて色々な合成法で)するか、他の方法で得、組体に結合させることができる。抗原は組体ポリマーの各分枝鎖を公知のペプチド合成法を用いて延長することによって組体上に合成してもよい。

第1図は本発明の実施に際して用いることができる樹木状ポリマーの構造を示す。これより分かるように、そのポリマーは8世代の樹木状ポリリシン生成物である。このポリリシンは従来の固相法でバム(Pam)樹脂又はポップ(POP)樹脂上にそのポリマーを生成させることによって製造することができる。ミッチェル(Mitchell)等のJ. Org. Chem., 43, 2848 (1978)及びタム(Tam)等のJ. Am. Chem. Soc., 102, 6117 (1980)を参照されたい。ポリマーを次に樹脂から、好ましくはHF: DMSを用いて溶解させる。図示されるように、この樹木状ポリリシンはベンジルリンカー(linker)を介して樹脂に元々結合されているグリシンリンカーから作られたものである。他のリンカー、例えばアラニンも用いることができる。リンカー

通常不要である。

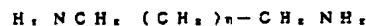
本発明を、便宜上、主としてコア分子としてのリシンにつくった生成物に適用される態様として説明した。事実、リシン、オルニチンのような分子に似たリシン、ノルリシン及びβ-アミノアラニンが本発明の生成物をつくるための好ましい分子である。と言うのは、それらは入手が比較的容易であり、処理が容易であり、しかも良好な収率を与えるからである。

このような分子は一般式



(式中、x、y及びzは0~10、好ましくは0~4の整数である。ただし、それらの少なくとも1つは1であり、かつそれらのアミノ基は同一炭素原子には結合することができない。)で表わすことができる。最も好ましい分子においては、x、y及びzの総数は2~6であり、アミノ基は少なくとも2個のメチレン基で隔てられている。

他の好ましいコア分子にエチレンジアミン及びそれより長い鎖を持つ同様の分子、例えばプロピレンジアミン及びブチレンジアミンがある。このような分子は一般式



(式中、nは0~10、好ましくは0~3の整数である)

で表わすことができる。

勿論、アンモニアもコア分子として用いることができる。

非常に多数の病気に対する合成ワクチンの開発が、ワクチンは自然蛋白質に基づく必要がなく、自然蛋白質の低分子量セグメントに基づくものでよいと言うことが認められるようになったため

は勿論使用を省いてもよいし、あるいは複数のリンカー分子を用いてもよい。

第1図は各分子が8個のペプチドを持つ樹木状ポリマーを示す。ここで、ペプチドの幾つかは、マラリヤ、例えば**プラスモジウム・バーゲ**(*Plasmodium berghei*)、**プラスモジウム・ファルシパラム**(*Plasmodium falciparum*)、**プラスモジウム・ビベックス**(*Plasmodium Vivax*)、**ビー・ヨエリ**(*P. yoelii*)、**ビー・マラリアエ**(*P. malariae*)、**ビー・オヤレ**(*P. ovale*)、**ビー・シノモルギ**(*P. cynomolgi*)、**ビー・ノーレシ**(*P. knowlesi*)等の原因プラスモジウム種の、各末端リシン残基上の利用可能官能基の各々に直接結合したT-細胞エビトープペプチドを表わし、他は同様に結合した原因プラスモジウム種のB-細胞エビトープペプチドを表わす。ポリマー上のB-及びT-エビトープは同じマラリヤ種のものである。本発明は単一種からの1個だけのT-及びB-エビトープの組み合わせを有するポリマーに限定されない。例えば、**ビー・ビベックス**のCS蛋白質からのT-及びB-エビトープと**ビー・ファルシパラム**のCS蛋白質からのT-及びB-エビトープを同時に有するMAPSも本発明の範囲内である。更に、ペプチドの、T-ヘルパーエビトープとして機能する能力は同一マラリヤ種からのB-細胞エビトープが共存することに必ずしも依存しない。従って、T-ヘルパーエビトープペプチドとB-細胞エビトープペプチドの交雑種(cross-species)の組み合わせも意図されるものである。選択されたエビトープの構造が比較的短かい、例えば6~14残基であるとき、ポリリシンをグリシン、アラニン又はβ-アラニンの単純なトリ-又はテトラ-ペプチド等のリンカーで延長することが最もよいことが観察されている。しかし、残基が14個より多い抗原ペプチドについてはリンカーは

に、最近著しく促進された。これらのセグメントは、通常免疫原性の決定因子又はエビトープと称されるが、自然蛋白質の抗原を有するスロボゾイトによる感染に対して防御する抗体の産生を刺激することができ、そして順次投与のかみ付きによって宿主哺乳動物に導入される。

本発明はロメロ(Romero)等がLoc. cit.において述べるもののようなマラリヤ起源のT-及びB-細胞エビトープペプチドに関する。この文献を本明細書において引用、参照するものとする。限定される訳ではないが、**ビー・バーゲ**のT-細胞エビトープペプチドの幾つかを下記に例示する。

表 示

YNRNTVNRLLAD	1
59 69	
NRKIERNNKLKQP	N
80 92	
NRDSYIPSAEXI	3
249 260	
KQIRDSITEENS	B-4
265 276	
ESGIRVNRKNGSNK	5
283 296	
SSIPNIVSNLGC	6
317 328	
NRKIERNNKLKQPPPPPNPNDPPPPPNPD	N + 17.1
KQIRDSITEENSPPPPPNPNDPPPPPNPD	B-4 + 17.1

最後の2つの抗原N+17.1とB-4+17.1はT-細胞エビトープN又はB-4とB-細胞エビトープとの組み合わせを表わす。

エビトープ17.1とその製造に関してはここに引用、参照するものとするデバラ (Zavala) 等の J. Exp. Med., 166, 1591 (1987) に記載されている。サーカムスボロゾイト蛋白質の場合、B-細胞エビトープ (これは偶然にも免疫優勢エビトープである) は事実上反復性で、例えばビー・バーゲイについては (DPFPNPN)x; ビー・ビバックスについては (DRAAGQPAC)x 若しくは (DRAAGQPAC)x 又は両者の組み合わせ; ビー・ファルシバラムについては (FANP)x; ビー・ノーレシについては (GAGDGGANAGRP)x 等である。ただし、x は少なくともある種のマラリヤ種については少なくとも2である。これら最小繰返単位の置換順列の繰返しでB-細胞エビトープペプチド、例えば (PNAX)x も生成する。

現在商業的に、あるいは公知の合成法若しくは単離法で入手可能な抗原ペプチドの置つかを以下の第1表に示す。この表には第2欄に示される病気又は病原体と関係がある蛋白質のセグメントであるペプチドが示されている。参照数字はそれらペプチド及びそれらを得る方法を述べている刊行物を確認するものである。アミノ酸については常用の略号が使用されている。

第1表

MAPを使用するワクチン開発に通じたペプチド配列

ペプチド	病原体/病気 (蛋白質)	参照数字
A. H-(Asn-Ala-Asn-Pro)n-CH ₃ n > 3	マラリヤ、P-ファルシバラムのCS蛋白質	1
B. H-(Gly-Asp-Arg-Ala-Asp-Gly-Gln-Pro-Ala)n-ON, n > 2	マラリヤ、ビー・ビバックスのCS蛋白質	2
C. Glu-Gln-Asn-Val-Glu-His-Asp-Ala	マラリヤ、ビー・ファルシバラムのPf155	3

られる。これらのT-細胞ペプチドがT-ヘルパーペプチドであるかどうかを証明するには、それらT-細胞ペプチドについて、そのT-細胞エビトープペプチドとB-細胞エビトープペプチドと共有結合させ、かくして形成された免疫複合体を用いてB-細胞エビトープに対する抗体の誘発試験を行なう。

前記において、アルファベットの文字はペプチドの技術分野において当業者が使用しているものと同じ意味を有する。これらは次の通りである。

A-アラニン	M-メチオニン
C-シスチン	N-アスパラギン
D-アスパラギン酸	P-プロリン
E-グルタミン酸	Q-グルタミン
F-フェニルアラニン	R-アルギニン
G-グリシン	S-セリン
H-ヒスチジン	T-スレオニン
I-イソロイシン	V-バリン
K-リシン	W-トリプトファン
L-ロイシン	Y-チロシン

本発明の1つの特定の利点は樹木状ポリマーが2種以上の異なるマラリヤ抗原の担体として役立つことである。これは多価ワクチン (即ち、1つより多いマラリヤ種に対して向けられるワクチン) の製造に、及び/又はマラリヤ寄生体の異なる段階に対するワクチンの製造に特に有用である。マラリヤに感染するT-細胞抗原とB-細胞抗原との両者が第2図において非限定様式で例証される様々な配置のいずれかで樹木状ポリマーに結合されている本発明の抗原生成物から製造されるワクチンは極めて高い抗体力価をつくり出し得るので、特に有用である。

D. Asn-Ala-Glu-Asn-Lys-Glu-Glu-Leu-Thr-Ser-Asp-Pro-Glu-Gly-Gln-Ile-His	マラリヤ、ビー・ファルシバラムのマロゾイト表面蛋白質	4
E. Asn-Ala-Asn-Pro-Asn-Val-Asp-Pro-Asn-Ala-Asn-Pro	マラリヤ、ビー・ファルシバラムのCS蛋白質	5

1. デバラ等の Science, 228, 1486 (1985)
2. マククッチャン (McCutchan) 等の Science, 230, 1381 (1985); アーノット・デー・イー・ (Arnott, D. E.) 等の Science, 230, 815 (1985)
3. ウドムサングベッチ (Udomsangpetch) 等の Science, 231, 57 (1986)
4. ラベッチ (Ravetch) 等の Science, 227, 1593 (1984)
5. ナーディン・イー・ユーチ (Nardin, E. H) 等の Science, 246, 1603 (1989)

更に、マラリヤT-ヘルパー細胞エビトープペプチドは、シンニグリア (Sinigaglia) 等の文献等において前記した通り、同定することができる。簡単に述べると、あるマラリヤ蛋白質のアミノ酸配列が分かると、その蛋白質のフラグメントに相当するペプチドは合成可能で、かつ哺乳動物に注射することができる。次いで、T-細胞を免疫化された哺乳動物の血液試料から収獲し、免疫化に使用したペプチドの存在下、試験管内でインキュベートすることができる。このようなペプチドは、T-細胞がそのようなペプチドの存在下でのそのようなインキュベーション中に増殖するならば、T-ヘルパー細胞エビトープペプチドであると考え

本発明のT-及びB-細胞エビトープをMAP基質に共有結合させると、得られる生成物は組換えCS蛋白質又は照射されたスボロゾイドにより過去において得られたものより10~100倍大きい抗体応答水準を引き出すことが発見された。更に、マウスにおいてはB-TモノマーのジエビトープはMAP基質に支持されなかったか、あるいはB-エビトープMAPとT-エビトープMAPの混合物は非常に低い抗体応答をもたらし、防御機能を示さなかったことも観察されている。本発明の現在のところ最も好ましい態様はT-エビトープペプチドとB-エビトープペプチドとの両者が樹木状ポリマー基質の同一官能基上にタンデムで結合されている場合の態様である。

本発明の具体的に選択されたB-エビトープとT-エビトープとは第2図に図示される通り種々の異なる配置でMAP基質に置くことができる。第2図はビー・バーゲイについて、それぞれP P P P N P D P P P P N P N D と K Q I R D S I T E E W S を含むB-エビトープ (白抜きブロック) とT-エビトープ (黒塗りブロック) との交互配置を示す。

第2図において、T-(4)とB-(4)とは4本の分枝鎖を持つがエビトープは1つだけであるモノマーマップである (再び、CS蛋白質の免疫優勢B-エビトープは少なくとも2つの繰返単体を同時に含む)。T-(8)とB-(8)とは同様であるが、分枝鎖は8本である。T(8)B及びB(8)-Tにおいては、樹木状ポリマーの分枝鎖上に8つのTエビトープ又はB-エビトープが、またポリマーの根に1つのB-エビトープ又はT-エビトープが存在する。BT-(4)、TB-(4)、BT-(8)及びTB-(8)がエビトープがタンデムで配置されている本発明の現在のところ好ましい生成物を例示するものである。

本発明ではマラリヤT-エпитープ及び同B-エピトープの組み合わせと数は多数意図され、それらも完全に本発明の範囲内であることは当業者であれば当然分かるだろう。

B-エピトープとT-エピトープとが分枝鎖上に交互に配置されている、即ち一方の分枝鎖がB-エピトープだけを有し、他方の分枝鎖はT-エピトープだけを有している本発明の生成物をつくることも可能である。例えば、第2図において、T/B(8)はT及びBのマラリヤ抗原を交互に配置して有する分枝鎖8本の樹木状ポリマーベースを表わすもので、これも本発明の範囲内である。T/B(4)はポリマーベースの分枝鎖が4本だけである点を除けばT/B(8)と同様である。

これは、アミノ基が異なるアミノ封鎖基で封鎖されており、封鎖基の一方は酸加水分解に対して安定であり、封鎖基の他方がアルカリ加水分解に対して安定である、リシンのようなジアミン化合物に基づく樹木状ポリマーを用いることによって直交防御性を用いて達成することができる。(例えば、第2図、E及びFの模式図を参照されたい。)

フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)は塩基に対して不安定な保護基であって、酸性脱保護に対しては完全に安定である。t-ブトキシカルボニル封鎖基(Boc)は50%トリフルオロ酢酸のような緩和な酸性条件下で安定である。Boc-Lys(Boc)-OH、Boc-Lys(Fmoc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH又はFmoc-Lys(Fmoc)-OHを選択することによって、1組の抗原をリシンのα-アミノ基に対して、もう1組の抗原をω-アミノ基に入れることが可能である。ペプチド合成の当業者であれば、逆の封鎖基と他の樹木状ポリマーとを用いて同一タイプの生成物を達成する方法を容易に高出することができる。

ルジンは油中水型でも水中油型でもどちらでもよい。例えばアカシア粉末、又はトリトン(Triton)のようなアルカリルポリエーテルアルコールのスルホン酸エステル若しくは硫酸エステルを含めて製剤上許容し得る乳化剤であればどれも用いことができる。

上記組成物のどれにでもソルビトール又は加水分解ゼラチンのような安定剤を添加することができる。ネオマイシンのような抗生物質又は感染を予防する他の抗感染剤と配合することは異例なことではない。

本発明の生成物は高い抗体力価を与えるので、多くの場合それら生成物はキャリアー又はアジュバントなしで使用される。しかし、アジュバントを用いる場合、それは哺乳動物の免疫原性を刺激するのに通常用いられるもののいずれからでも選択することができる。これには、例えばフロインドアジュバント(完全又は不完全)、アジュバント65(ビーナッツ油、マンナイド(mannidol)モノオレエート及びモノステアリン酸アルミニウムを含有する)、及び換酸アルミニウム又は明ばんのような鉱物質ゲル;死菌ボーデテラ(Killed Bordetella)、破傷風トキシノイド、ジフテリヤトキシノイド、ムラミルジペプチド、水酸化アルミニウム、サポニン等があるが、前記のように本発明のポリマー基質を用いる場合はこのようなアジュバント又はキャリアーは必要がない。フロインドアジュバントは、代謝されない鉱油を含有し、潜在的な発がん原であるので、ヒト用又は食物に付く動物用のワクチン処方物には最早使用されない。それは食物に付かない動物用のワクチンに用いることができる。鉱物質のゲルは市販の家畜ワクチンに広く用いられている。

本発明のワクチンは上記の一般的な性質を持つ製剤上許容し得

本明細書に示され、議論された構造について多くの変形が可能であることは当業者には明白であろう。例えば、樹木状ポリマーはセグメントがジスルフィド橋を介して結合されている構造を有してもよい。斯る構造は根が分子状炭素のような緩和な酸化剤で酸化される保護されたシスチンを含有している樹木状ポリマーから容易に形成することができる。

もう1つの例として、第1図を参照して説明すると、樹木状ポリマーの根にあるグリシン、即ち遊離のグリシンは樹木状ポリマー分子の分枝鎖上にあるペプチド抗原と同一でもよいしあるいは異なるものであってもよいT-又はB-マラリヤペプチド抗原に結合させるか、又はそのようなT-又はB-マラリヤペプチド抗原で置換することができる。T-及びB-ペプチド抗原自体は他のリシン又は同様の分子を結合させて追加的分枝鎖を与えることができる基として役立つ。ここで、これら追加的分枝鎖には更に追加のペプチド抗原、抗生物質又は非ペプチド抗原を結合させてもよい。

本発明の生成物は当業者に公知の方法の何れかを用いてヒトを含めて哺乳動物のマラリヤ感染に対して防御するのに有用なワクチンを製造するのに用いることができる。これら生成物は、例えば、製剤上許容し得る塩置又は希釈剤、例えば不活性な油、適当には、ゴマ油、ビーナッツ油又はオリーブ油のような植物油に懸濁させることができる。別荘として、本発明の生成物はpH約5.6〜7.4の水性等張緩衝液に懸濁させてもよい。このような溶液は、典型的には、塩化ナトリウムにより等張とされ、くえん酸ナトリウム-くえん酸により又は燐酸塩により緩衝される。溶液はメチルセルロースのような増粘剤を用いて増粘してもよい。

ワクチンはまたエマルジョン形態として調製してもよい。エマ

るキャリアーをある量の本発明の抗原性生成物、即ち免疫応答、即ち哺乳動物における防御抗体応答をもたらしに十分な量を選択されたT-又はB-細胞エピトープと共に含んで成るものと定義することができる。有効量は非常に少ない。有効量は、公知のように、抗原により定まる。有効量を組成する量はワクチンが第一治療として意図されたものであるのか、それとも増強治療として意図されたものであるかに依存して変わるだろう。

MAPの量は特定の免疫原、種々の被検対象において免疫原が引き出す応答、及び異型キャリアー又はアジュバントの存在若しくは非存在に依存して変わる。一般的に言えば、約1〜約1,000マイクログラムの範囲内の量のMAPが予定される。最適量は、この技術分野で周知のように、抗体力価、その他哺乳動物の免疫応答の諸パラメーターの測定を含む日常的な実験により確かめることができる。繰返免疫化が好ましい。

本発明の生成物は、使用直前に製剤上許容し得るキャリアーを用いて再構成されるだけの凍結乾燥粉末として提供するのが便利であるだろう。

ワクチンの調製と付随事項についての追加情報は周知である。例えば、1986年8月20日公開の、スミスクリン・ベックマン(Smithkline Beecham)の欧州特許出願第A、191,748号、1986年8月27日公開の、スミスクリン・ベックマン等の欧州特許出願第A、192,626号、米国特許第4,693,994号、同第4,707,357号、同第4,735,799号及び同第4,767,622号明細書を参照されたい。

引用された特許、特許出願及び文献は全てその全体を本明細書において引用、参照するものとする。

かくして、本発明はまたマラリヤ細菌による感染に対して哺乳

動物に免疫を与える方法を提供するものである。この本発明の方法はマラリヤT-及びB-ペプチド保有MAPを含んで成る化合物又は組成物を、好ましくは哺乳動物がマラリヤ菌にさらされる前に哺乳動物にマラリヤT-及びB-ペプチド保有MAPを含んで成る化合物又は組成物を免疫学的に有効な量で投与することから成る。ここで、上記有効量はマラリヤ菌による感染に就いて宿主哺乳動物に起こる寄生虫血症を抑制するのに有効な量である。

マラリヤ菌源T-及びB-ペプチド保有MAP及び任意成分としての製剤上許容し得るキャリアー又は稀釈剤を含んで成る免疫原性化合物を有効量で含む、マラリヤのスプロゾイト、その他の段階でのマラリヤ感染を抑制するのに有用なワクチンも意図される。

当業者には明白なように、本発明の生成物は、その着想を理解してしまつと、当業者には周知の方法で製造することができる。Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85, 5409 (1988); プロスネット (Prossnet) 等の J. Biol. Chem., 263, 1719 (1988); 及びチュナグ (Chenag) 等の Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4929 (1988) に記載されタム (Tam) 法はその例である。これらの文献を全て本明細書において引用、参照するものとする。

MAP合成に適用可能な若干の一般的観察結果は当業者にとって助けになるだろう。これらは次の通りである:

1. この合成に要するカップリング時間は一般に長い(2-4時間)。
2. ジメチルホルムアミドが一般的には二塩化メチレンよりも適当な溶剤である。

抗 体	抗 体 応 答	
	I P A 力価 スプロゾイト	R I A 力価 r C S 蛋白質
スプロゾイト ^a	2,048	8,192
組換えCS蛋白質 ^a	2,048	2,048
モノマーBTペプチド ^c	800	1,024
BT-MAP (4) ^c	128,000	408,000
TB-MAP (4)	32,000	400,000
BT-MAP (8)	24,000	100,000
TB-MAP (8)	64,000	400,000

a. H-2^a ハロタイプ (Balotype) のマウス4匹 (B10、A菌株) に照射済みビー・バーゲンのスプロゾイトを投量 1×10^5 で2回、2週間間隔で静脈注射した。血清を集め、最後の注射後10日間ブールして置いた。最高ボジティブの血清希液の逆転として表わされる抗体力価を間接免疫蛍光検定法 (I P A) ではグルタルアルデヒド固定ビー・バーゲンスプロゾイトを、放射線免疫検定法 (R I A) では組換えCS蛋白質を用いて得た。

b. H-2^a ハロタイプのマウス4匹 (A/J菌株) に日数0ではCFA中に乳化させた組換えCS (r C V S) ビー・バーゲン蛋白質 $25 \mu\text{g}$ を i. p. 注射し、また日数15日ではI P Aでr C S蛋白質 $25 \mu\text{g}$ を s. c. 注射した。10日後に血清を集めた。

c. H-2^a ハロタイプマウス5匹 (A/J菌株) にビー・バーゲンCS蛋白質免疫優勢領域の繰返単位が2回、ビー・バーゲンCS蛋白質誘導T-細胞エリトープペプチドが1回現われるペプチド免疫原を各50マイクログラム i. p. 注射した。免疫化の計画及び検定方法は組換えCS蛋白質についてのものと同様で

3. ペプチド樹脂は再溶解が極めて困難であるので合成のいかなる段階でも乾燥すべきでない。

4. カップリングはその完結について定量的ニンヒドリン法でよく監視すべきである。

5. MAPは改良酸保護法で、強酸触媒による場合の副反応を回避するためにジメチルスルフィド中でHFか又はT F M S Aを用いて樹脂から一番良く解離される(タム等の J. Am. Chem. Soc., 105, 8442 (1983) 及び J. Am. Chem. Soc., 108, 5242 (1986))。

6. MAPは樹脂支持体から解離された後強く凝集する傾向がある。精製は、解離反応の望ましくない芳香族添加物、例えばパークレゾール及びチオクレゾールを除去すべく、單素及びメルカプトエタノール中B Mの透析媒体中、塩基性、強力酸性条件下での長時間透析で行うのが一番良い。所望によっては、高性能のゲル透過クロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いて更に精製を行ってもよい。ほとんどの場合、MAPは更なる精製なしで直接使用可能である。

表1はマウスに免疫応答を引き出す本発明生成物の効果を測定するために行った幾つかの試験の結果を要約して示すものである。これより、本発明のMAPベース生成物は照射済みスプロゾイト、組換えCS蛋白質又はモノマーBTのペプチドに比較して均一な高抗体力価を有することが認められる。また、その応答はBT免疫原の構造により変化することも認められる。

表1: ビー・バーゲンの色々な免疫原により誘発され、組換えCS蛋白質とスプロゾイトを用いて検定された抗体力価の比較

あった。

かくして免疫化されたマウスを各2000スプロゾイトと対抗させると、BT-MAP (4) はマウスの80%に完全防御(すなわち、寄生虫血症の防止)をもたらし、TB-MAP (4) はマウスの60%を覆り、BT-MAP (8) はマウスの50%を覆り、TB-MAP (8) はマウスの60%を覆った。

本発明によるMAPは次のようにして合成することができる。

次の略号の幾つかが合成例の中で用いられている:

B o c - L - トレプトキシカルボニル
T F A - トリフルオロ酢酸
D M F - ジメチルホルムアミド
D C C - ジシクロヘキシルカルボジイミド
T o s - トシル
B z - ベンジル
D n p - ジニトロフェニル
2 C l - 2-クロロカルボベンゾキシ
D I B A - ジイソプロポイルエチルアミン
T F M S A - トリフルオロメチルスルホン酸
B S A - ウシの血清アルブミン
H P L C - 高性能液体クロマトグラフィー
T B R - 腫瘍保有ラビット
A T P - アデノシントリホスフェート
D n p - ジニトロフェニル
C I Z - クロロベンジルオキシカルボニル
B r Z - ブロモベンジルオキシカルボニル
E L I S A - 酵素結合免疫吸着検定

実施例1

多重抗原ペプチド合成の一般的方法

ペプチドの抗原を持つ8分枝マトリックスコアの合成をBoc- β -Ala-OCH₃-Pam樹脂に対して、樹脂0.5gの典型的規模(0.05 mmol)及び本合成についての樹脂置換レベル1.0 mmol/g、ただしコマトリックスのより高い分枝を用いたときは前記レベルより若干低かった)で、段階的固相法[メリフィールド・アール・ビー(Herrifield, R.B.のJ. Am. Chem. Soc., 85, (1963)]に手動で行った。Boc基の50% TFAによる脱離と得られた塩のDIEAによる中和後に、4モル過剰の、Boc-Lys(Boc)(0.2 mmol)の予備形成した対称無水物を用いてDMF中で粗体-コアの第一レベルの合成を達成し、次いでCH₂Cl₂中でDCCにより再カップリングさせた。第二及び第三レベルを同じプロトコル(protocol)でそれぞれ0.4 mmol及び0.8 mmolの前以って活性化したBoc-Lys(Boc)を用いて合成して8分枝Boc-Lys(Boc)-コマトリックスを得た。ただし、ペプチド-抗原配列の前後続カップリングには1.6 mmolの前以って活性化されたアミノ酸が必要である。ペプチド-抗原の合成のための保護基は次の通りである:3官能性アミノ酸の α -アミノ末端基についてはBoc基、同アミノ酸のほとんどの側鎖についてはベンジルアルコール誘導体、即ちArg(Tos)、Asp(OBzl)、Glu(OBzl)、His(Dnp)、Lys(2CZ)、Ser(Bzl)、Thr(Bzl)及びTyr(Bzl)。重量と容量の幾何学的増加の故に、樹脂のg当り溶剤30 mlという新しい容量比を用いた。TFAによる脱保護(20分)をTFAで2回、各2分間予備洗浄することによって前以って行った。DIEAによる中和はCH₂Cl₂中で行い(5% DIEA)、かつDMFの追

加中和も行った(2% DIEA)。Arg、Asn、Glu及びGlyを除く全残基について第一カップリングを前以って形成した前記対称無水物を用いてCH₂Cl₂中で行い、第二カップリングをDMF中で行った。各カップリングは2時間であった。Boc-AsnとBoc-Glyとのカップリングは予備形成した1-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステルによりDMF中で実現させた。Boc-GlyとBoc-Argとはジペプチドの形成及びラクタムの形成の危険をそれぞれ避けるためにDCC単独でカップリングさせた。カップリングは全て各サイクル後に定量的ニンヒドリンテスト[サリン・フィ・ケー(Sarin, V. K.)等のAnal. Biochem., 117, 147 (1981)]でモニターし、そして必要ならばDMF中、50℃で2時間の対称性無水物の第三のカップリングを用いた[タム・ジェー・ビー・"Proc. Am. Pept. Symp., 第9回"(シー・エム・デバー(C. M. Deber)、ケー・ディー・コッペル(K. D. Koppel)及びビー・ジェー(V. J.))。この合成をN, N-ジメチルピリジジ0.3 mmolを含有する無水酢酸/DMF(3 mmol)中でのアセチル化により停止させた。

MAPの完結後、保護されたペプチド-樹脂(0.3 g)をHis(存在する場合)のN¹⁰-ジニトロフェニル保護基を除くためにDMF中で8時間1 Mチオフェノールで処理し(反応を完結させるのに必要ならば50℃で3回)、N-Boc基を除くために50% TFA/CH₂Cl₂(10 ml)で5分間処理し、そして粗MAPを得るために隔壁に関する低/高-HF性[タム・ジェー・ビー・ヒース・ダブリュー・エス(Heath, M. F.)及びメリフィールド・アール・ビーのJ. Am. Chem. Soc., 105, 6442 (1983)]又は低-高TFMSA性[タム・ジェー・ビー、

ヒース・ダブリュー・エフ及びメリフィールド・アール・ビーのJ. Am. Chem. Soc., 108, 5242 (1986)]により処理した。この粗ペプチドを次に冷エーテル/メルカプトエタノール(99:1, v/v, 30 ml)で洗浄してp-チオクレゾールとp-クレゾールを除去し、そして0.1 M トリス(Tris)バッファー(pH 8)中8 M 尿素、0.2 M ジチオスレイトール100 mlに抽出した。開裂工程で生成した全ての残留芳香族側鎖生成物を除去するために、透析管材料中のペプチド[スペクトル・ボル(Spectra Por) 6, MWのカットオフ1,000]を尿素8 M、NH₄CO₃/CO₂(2H₂O)₂CO₂ 0.1 M含有するpH 8.0の脱気され、かつN₂バージされた溶液中で0.1 Mのメルカプトエタノールと0.1 Mで24時間平衡させた。透析を次に全てpH 8.0の0.1 M NH₄CO₃-(NH₄)₂CO₃緩衝液中8 Mの、次いで2 Mの尿素中で12時間、続いてH₂O及び1 M HOAc中で逐次的に続けて尿素を全て除去した。次いで、凍結乾燥したMAPを高性能のゲル透過クロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーでバッチ式で精製した。精製された物質は全て満足すべきアミノ酸分析を与えた。

実施例2

ブラモジウム・ファルシバラムのスポロゾイト段階の誘導されるペプチドである(Asn-Ala-Asn-Pro)-MAP(NP-16 MAP)の合成と精製

ペプチド・(Asn-Ala-Asn-Pro)-Lys-Lys-Lys-OHを実施例1に記載の一般的方法で合成した。

この合成はBoc-Lys(Boc)-OCH₃-Pam-樹脂(コポリ[スチレン-1%-ジビニルベンゼン樹脂])を用いて置換度0.11 mmol/g-樹脂において開始させた。置換は3レ

ベルのBoc-Lys(Boc)の逐次添加後0.88 mmol/gであることが見い出され、8分枝構造の(Boc-Lys(Boc))-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OCH₃-Pam樹脂を与えた。この合成を改良ベックマン890合成装置[カリフォルニア州、パロ・アルト(Palo Alto)のベックマン・インストラクションズ(Beckman Instructions)中で樹脂2.5 gを用いて続けた。合成はカップリング工程を全て最適化したコンピュータプログラムを用いて行った。例えば、Boc-AlaとBoc-Proとのカップリングは酸量と不完全カップリングを最小限に抑えるCH₂Cl₂:ジメチルホルムアミドの溶剤比(1:3 v/v)で対称性無水物法により実現させた。Boc-Asnのカップリングは予備形成した1-ヒドロキシベンゾトリアゾール活性エステルによって同一溶剤中で行った。各アミノ酸はカップリング収率を最大となし、かつ反応を>99.5%完結まで本質的にもってゆくに二重カップリングプロトコルを受けた。

保護ペプチド-樹脂を部分、部分に分けて脱保護した。最初の脱保護は乾燥済みペプチド-樹脂1.57 gを用いて反応容器中で実施し、そしてBoc-保護基及び他の外来物質を除去するために次の操作に付した:CH₂Cl₂(3×1分洗浄):CH₃CO₂H-CH₂Cl₂(1:1, 3×2分)及びCF₃CO₂H(3×2分洗浄)、次いで次の脱保護試剤:トリフルオロメタンスルホン酸:トリフルオロ酢酸:テトラヒドロチオフェン:m-クレゾール(mlで4:20:12:4)を含有する4℃における3.5時間の反応。スルフィド補助解離操作のアシドリシス解離により放出されたペプチドを集め、-30℃に予冷されたエチルエーテル(230 ml)で沈殿させた。沈殿物を遠心分離してペレットとなし、そしてエチルエーテルを真空下除去した。ペプチドを次に0.01 M HOAcに溶

解し、そして12gの0.01M HOAc 中で透析した。ペプチドを次に凍結乾燥して60mgの(Asn-Ala-Asn-Pro)₃ MAPを得た。解凍後得られた樹脂を加水分解すると、ペプチドの約90%が樹脂支持体から解離されていたことが示された。この低収率はペプチドのエーテルによる沈殿が不完全であることによるものであった。同じペプチド樹脂(1.0g)をHF-アニソール(B:1v/v、全部で10ml)によっても0℃で1時間解凍させて、10~100%のHOAcによる長い抽出後に220mgのMAPを得た。粗収率は33%であった。透析を10% OAcを用いて行った。

透析後のペプチドを次にアミノ酸分析(6NHCNによる加水分解後)でまず分析した。見いだされたMAPのモル比はAsn:Ala:Pro:Lys=1.97(2):1.03(1):1(1):0.26(0.22)であった。これはカンコの中に示される予想理論値と一致するものであった。

実施例3

マラリヤ起源のT-細胞抗原及びB-細胞抗原を含有するジエピトープ多量抗原ペプチド合成の一般的方法

(a) 方法A、2個のエピトープのタンデムでの結合

ジエピトープMAPの合成は前記実施例に記載したモノエピトープMAPと同様のBoc-Ala-OCH₂-Pam樹脂(0.1molのAlaが樹脂1g中に存在する)に対する段階式固相法で手動式で達成した。50%TFAによるBoc基の脱離及びDIEAによる得られた塩の中和の後に、Boc-Lys(Boc)-Ala-OCH₂-Pam樹脂を形成する、粗体コアについての第一レベルの合成をCH₂Cl₂中で4モル過剰のBoc-Lys(Boc)を用い、DCC単独により達成した。第二及び

第三レベルの合成を同一プロトコルにより行って8分枝Boc-Lys(Boc)のコアマトリックスを得た。この点から先きでは、ペプチド抗原又は2つのエピトープの合成は、それらがタンデムで配列され、それらがあたかも1つの抗原であるかのように処理されるので、レプトキシルボニル/ベンジル保護基の手法を使用して前記実施の合成と同様に進めた。場合によっては、テトラペプチド-Gly-Pro-Pro-Glyのようなスパーサーを2つのペプチド抗原間に挿入して柔軟性を出すようにする。合成の完結後、MAP樹脂をTFAで処理してN-Boc基を除去し、次にCH₂Cl₂中で10%無水酢酸/10%DIEAによりアセチル化し、最後に低-高HF法により開裂させてMAPを樹脂支持体から除去した。粗ペプチドを次に冷エーテル/メタノール(99:1v/v)で洗浄してp-チオクレゾールとp-クレゾールを除去し、そして0.1Mトリス、HCl緩衝液(pH8.0)中8Mの尿素に抽出した。開裂工程で生成した残留芳香族副生成物を除去するために、MAPを8Mの尿素中で透析し(スペクトル・ポル6、分子量のカットオフ1,000)、次いで0.1Mの酢酸中で2回5~6時間透析して尿素を除去した。これらのMAPをH₂Oから3回凍結乾燥して酢酸を除去した。

(b) 方法B、リシンのアミノ基の交互分枝による2以上のエピトープの結合

リシンには2個のアミノ基が存在するので、またこれら2個のアミノ基は選択的に保護することができると思われるので、そのN-Et₃N基を酸に不安定なBoc基で保護し、N-H₂基を塩基に不安定なFmoc(フルオレニルメチキシルボニル)基により保護し、または逆も同様に、即ちN-H₂基をFmoc基で保護し、N-Et₃N基をBoc基で保護するそのような製造法でコアマトリックスは合成

できると思われる。この選択性を利用してこのコアマトリックスの合成を達成するために、N-Et₃N-Boc及びN-H₂-Fmocを含有するコアマトリックスを例証する。このコアマトリックスの合成は第一及び第二レベルの分枝のためにBoc-Lys(Boc)を用いる前記実施例に記載したものと同様であった。第三レベルにおいては、コアのLys分枝のためにFmoc-Lys(Boc)を使用して各々についてLys(Boc)及びFmoc-Lys末端基を与えた。第一エピトープ(又はタンデム配置の2つのエピトープ)の合成では前記実施例に記載したBoc/ベンジル化学を使用した。この合成中に中和時間をFmoc基の早期開裂を最小限に抑えるために1分に短縮した。第二エピトープの合成ではFmoc/tert-ブチル化学を採用し(即ち、N-H₂基をFmocで保護し、側鎖をtert-ブチルアルコール誘導保護基で保護する)、Boc-Asn₂アミノ酸を使用する第一エピトープを完結させた後その合成を開始させた。Fmoc-Asn₂アミノ酸を次の通りの3官能性アミノ酸側鎖保護基と共に使用した: Glu(OBu^t), Asp(OBu^t), Lys(Boc), Thr(Bu^t), Ser(Bu^t), Tyr(Bu^t), Arg(Pm₂), His(Trt), Trp(For)及びCys(Bu^t)。N-Fmocの繰返保護はジメチルホルムアミド中20%のピペリジンにより行い、そしてピペリジンによる1回の予備洗浄に続いてDMF中でDCC:HOBu^tによりカップリングを試みた。合成完結後、MAP樹脂を低-高HFにより処理してペプチド鎖を樹脂から脱離させた。この処理と精製は前記実施例に記載のものと本質的に同じである。Fmoc、tert-ブチル化学を採用してこのペプチド鎖を組み立てる手順は次の通りであった: (1) DMF 20ml(3×1分); (2) ピペリジン/DMF(1:1

v/v) 20ml(1分); (3) ピペリジン/DMF(1:1 v/v) 20ml(10分); (4) DMF 20ml(3×1分); (5) CH₂Cl₂ 20ml(3×1分); (6) DMF 20ml(2×1分); (7) DMF 5ml中アミノ酸(4当量)(5分)、DMF中HOBu^t(4当量)、CH₂Cl₂中DCC(4当量)を2時間添加; (8) DMF 20ml(4×2分); (9) CH₂Cl₂ 20ml(2×2分)。

(c) 方法C、前以て形成した2つの異種MAPのジスルフィド結合を介しての2種以上のエピトープの結合

2種以上のエピトープを前以て形成した2種のMAPのジスルフィド結合を介して結合するために、Cys(Acm)-Alaのようなジペプチドを実施例3a又は3bに記載されるようにしてそれら予備形成MAPのカルボキシル末端において付加させる。これは常法で達成することができ、次いでBoc-Cys(Acm)をBoc-Ala-OCH₂-Pam樹脂に付加させることによるコアマトリックスの合成を開始させた。ジペプチド-Boc-Cys(Acm)-Ala-OCH₂-Pam樹脂の形成、即ちコアマトリックスの合成の後、前記方法を使用する1種以上のペプチド抗原の組み込みを進めてCys(Acm)-AlaジペプチドCOOH-の尾を有する上記予備形成MAPを得た。Cys(Acm)はHF脱保護法に対して安定である。このCOOH-Cys(Acm)-Alaジペプチドの尾を有する予備形成MAPを精製した。2つの異種予備形成MAPの二量化は1.によるジスルフィドへの酸化により達成したが、これによりAcm基のシステニル残基からの脱離も付随的に起こる。詳細な手順は次の通りであった。1molのMAPに対して、Cys(Acm)を有する異種の予備形成ジエピトープMAPを脱気されかつN、

で精製された50%酢酸溶液に室温で溶解し、J₁のMeOH溶液(1M溶液)50mlを0℃で1時間ベッチ式で加えた。1Mの水溶性チオ硫酸ナトリウム(又はアスコルビン酸)を黄色が除かれるまで加えることによって反応を停止させた。MeOHを0.1酢酸中での透析により除去し、そして所望とされたMAPをゲル透過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー又は逆相高圧液相クロマトグラフィーで精製した。

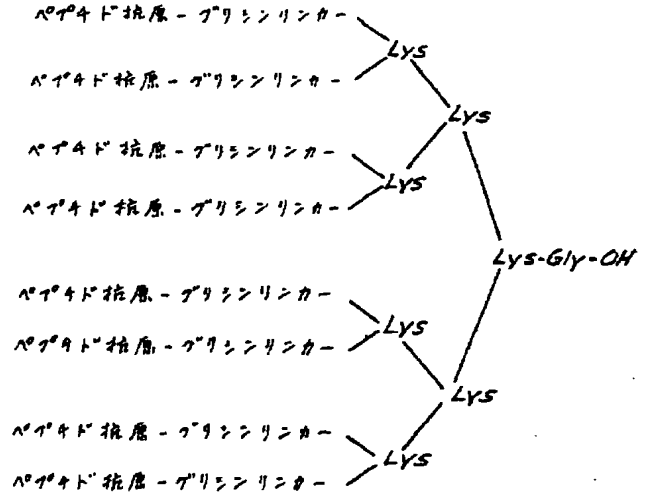


FIG.1



FIG.2 A

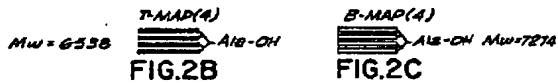


FIG.2B

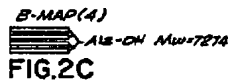


FIG.2C

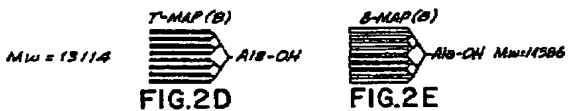


FIG.2D

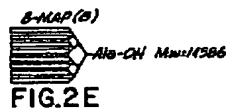


FIG.2E

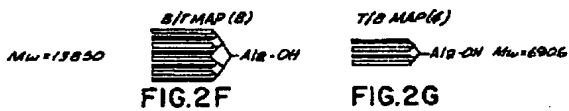


FIG.2F

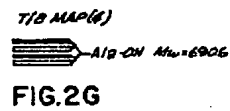


FIG.2G

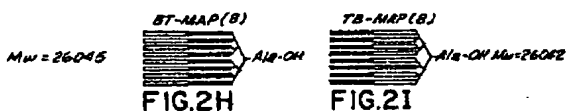


FIG.2H

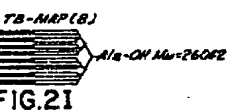


FIG.2I

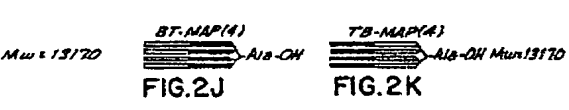


FIG.2J



FIG.2K

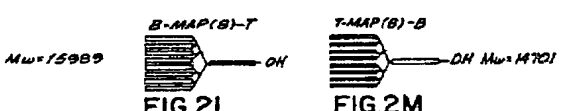


FIG.2L

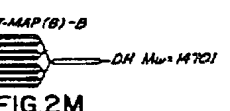


FIG.2M

手続補正書(自発)

平成3年3月5日。

特許庁長官 殿

1.事件の表示

PCT/US90/02039

2.発明の名称

抗マラリアワクチンとして有用な多重抗原
ペプチドの樹木状ポリマー

3.補正をする者

事件との関係 特許出願人

(発明者) ザ ロックフェラー ユニバーシティ (他1名)

4.代理人 千100

住所 東京都千代田区有楽町1丁目7番1号
有楽町電気ビル506号室電話3212)7830番

氏名 (5930) 弁理士 三宅 正 夫 (他1名)

5.補正命令の日付 自 発

6.補正により増加する請求項の数 0

7.補正の対象

特許法第184条の5第1項の規定による書面の特許出願人の
代表者の欄、委任状及びその訳文、明細書及び請求の範囲
の翻訳文のタイプ印書(内容に変更なし)

8.補正の内容 別紙の通り

方 式
審 査

Downloaded At: 11:53 11 September 2009

⑤Int. Cl. ⁸

7/08

C 07 K 7/10 99:00

C 07 K 99:00

識別記号

厅内整理番号

ZNA Z 8318-4H

8318-4H

8318-4H

⑦発 明 者 ザバラ、フィデル ビイ.

⑦出 願 人 ニューヨーク ユニバーシティ

アメリカ合衆国、10012 ニューヨーク、ニューヨーク、ブリーカー
ストリート 110、アパートメント 23エフ

アメリカ合衆国、10012 ニューヨーク、ニューヨーク、ワシントン スクエア サウス 70